

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

Select All       Clear Selections       Print/Save Selected       Send Results       Display Selected      Format Free

---

1.  3/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010714071

WPI Acc No: 1996-211026/199622

XRAM Acc No: C96-067486

Prodn. of fructosyl amino acid oxidase enzyme by culturing  
Fusarium - in fructosyl lysine-contg. medium, is active on fructosyl  
lysine and fructosyl valine, useful for detection of amadori cpds.

Patent Assignee: KYOTO DAIICHI KAGAKU CO LTD (KYOT-N); KYOTO DAIICHI KAGAKU  
KK (KYOT-N)

Inventor: ISHIMARU K; KATO N; SAKAI T; SAKAI Y; TANI Y

Number of Countries: 009 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 709457	A1	19960501	EP 95115525	A	19951002	199622 B
JP 8154672	A	19960618	JP 95249421	A	19950927	199634
US 5712138	A	19980127	US 95536190	A	19950929	199811
CN 1161374	A	19971008	CN 96107304	A	19960403	200309 N

Priority Applications (No Type Date): JP 94241556 A 19941005; CN 96107304 A  
19960403

Cited Patents: 02Jnl.Ref; EP 526150; EP 576838

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 709457	A1	E	26	C12N-009/06	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): CH DE FR GB IT LI

JP 8154672	A	15	C12N-009/06	
------------	---	----	-------------	--

US 5712138	A	18	C12N-009/02	
------------	---	----	-------------	--

CN 1161374	A		C12N-009/06	
------------	---	--	-------------	--

Abstract (Basic): EP 709457 A

Prodn. of fructosyl amino acid oxidase enzyme (I), which acts on both fructosyl lysine and fructosyl valine, comprises culturing a (I)-producing Fusarium strain in a medium contg. fructosyl lysine. Also claimed is a process for producing (I) by culturing a fungus in a medium contg. an opt. protected fructosyl amino acid and/or a glycated protein.

USE - (I) is useful in assays for amadori cpds. in which the sample is contacted with (I) and the amt. of O<sub>2</sub> consumed or the amt. of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated is measured (claimed). Such assays are esp. useful for determining glycated protein or fructosamine levels in body fluid samples, e.g. for diagnosis or monitoring of diabetes. They may also be used for food analysis.

Dwg. 0/9

Title Terms: PRODUCE; FRUCTOSYL; AMINO; ACID; OXIDASE; ENZYME; CULTURE; FUSARIUM; FRUCTOSYL; LYSINE; CONTAIN; MEDIUM; ACTIVE; FRUCTOSYL; LYSINE; FRUCTOSYL; VALINE; USEFUL; DETECT; AMADORI; COMPOUND

Derwent Class: B04; D16; J04

International Patent Class (Main): C12N-009/02; C12N-009/06

International Patent Class (Additional): C12N-001/14; C12Q-001/26;  
G01N-031/00; G01N-033/50; C12N-009/06; C12R-001-77

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-154672

(43)公開日 平成8年(1996)6月18日

(51)Int.Cl.  
C 12 N 9/06  
C 12 Q 1/26  
G 01 N 31/00  
33/50  
// (C 12 N 9/06

識別記号 B  
B  
6807-4B  
V  
Z

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数11 O.L (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-249421  
(22)出願日 平成7年(1995)9月27日  
(31)優先権主張番号 特願平6-241556  
(32)優先日 平6(1994)10月5日  
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000141897  
株式会社京都第一科学  
京都府京都市南区東九条西明田町57番地  
(72)発明者 加藤 帽夫  
京都府亀岡市西つつじヶ丘美山台2丁目3  
番18号  
(72)発明者 阪井 康能  
滋賀県大津市本宮2丁目40-8  
(72)発明者 谷 ▲吉▼樹  
京都府京都市北区上賀茂菖蒲園町56, 60番  
合地-1  
(74)代理人 弁理士 青山 葉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】 新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、特に糖尿病の病状の診断及び症状の管理、食品の品質管理の促進に寄与し得るフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供する。

【解決手段】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産能を有するフサリウム属 (Fusarium) の菌をフルクトシリジン及び/又はフルクトシルN<sup>ε</sup>-Z-リジン含有培地で培養することにより生産されるF AOD及びフサリウム属の菌を培養し、培養物から酵素を分離することからなるF AODの生産方法、それを用いるアマドリ化合物の分析法、該分析法のための試薬及びキット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産能を有するフサリウム属 (*Fusarium*) の菌をフルクトシリジン含有培地で培養することにより生産されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼであって、フルクトシリジン及びフルクトシルバリンに対する活性を有するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項2】 フルクトシリジンに対する活性がフルクトシルバリンに対する活性と同等かより高いことを特徴とする請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項3】 フルクトシリジン含有培地が、グルコースとリジン及び/又はN<sup>α</sup>-Z-リジンを温度100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することにより得られる、フルクトシリジン及び/又はフルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジンを含有するものである請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項4】 フサリウム属の菌が、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. リニ(IF0 NO. 5880) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. バタタス(IF0 NO. 4468) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *bata tas*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. ニベウム(IF0 NO. 4471) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. クメリニウム(IF0 NO. 6384) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. メロンゲナエ(IF0 NO. 7706) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. アピ(IF0 NO. 9964) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*)、フサリウム・オキシスボルム・f. sp. ピニ(IF0 NO. 9971) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pin i*)及びフサリウム・オキシスボルム・f. sp. フラガリエ(IF0 NO. 31180) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)からなる群から選択されるものである請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項5】 下記の理化学的特性を有するものである請求項1～4のいずれかに記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 安定pHは4.0～13.0、至適pHは8.5であり；
- 3) 安定温度は20～50℃、至適温度は30～35℃であり；
- 4) スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約106,000(106kDa)である。

【請求項6】 遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び/又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミ

ノ酸オキシダーゼを生産させることを特徴とする、請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの生産方法。

【請求項7】 フサリウム属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生産することができる菌株をフルクトシリジン及び/又はフルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】 アマドリ化合物を含有する試料と、請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法。

【請求項9】 試料が生体成分であり、アマドリ化合物の分析が、該生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量によりなされることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】 請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキット。

【請求項11】 生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量のために用いられることを特徴とする請求項10記載の分析試薬又はキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼに関し、さらに詳しくは、フサリウム属 (*Fusarium*) の菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、該酵素の生産方法、該酵素を用いたアマドリ化合物の分析法、及び該酵素を含有する試薬及びキットに関する。

## 【0002】

【従来技術】 アマドリ化合物は、タンパク質、ペプチド及びアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、アルドースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができると考えられている。アマドリ化合物を含有する物質としては、醤油等の食品、及び血液等の体液がある。生体では、グルコースとアミノ酸が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン誘導体が生成している。例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映してお

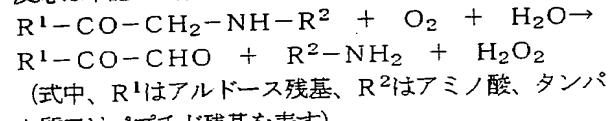
3

り、その測定値は、糖尿病の症状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床上、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。このように、アマドリ化合物の定量分析は医学及び食品を含む広範な分野で有用である。

【0003】従来、アマドリ化合物の定量法としては、高速液体クロマトグラフィーを利用する方法 [Chromato gr. Sci. 10: 659 (1979)]、ホウ酸を結合させた固体をつめたカラムを用いる方法 [Clin. Chem. 28: 2088-2094 (1982)]、電気泳動 [Clin. Chem. 26: 1598-1602 (1980)]、抗原-抗体反応を利用する方法 [J. J. C. L. A. 18: 620 (1993), 機器・試薬 16: 33-37 (1993)], フルクトサミンの測定法 [Clin. Chim. Acta 127: 87-95 (1982)], チオバルビツール酸を用いて酸化後比色定量する方法 [Clin. Chim. Acta 112: 197-204 (1981)]などが知られているが、高価な機器が必要であったり、必ずしも正確で迅速な方法ではなかった。

【0004】近年、酵素の有する特性（基質、反応、構造、位置などの特異性）に起因して、選択的に目的物質を迅速かつ正確に分析することができることから、酵素反応を利用する方法が臨床分析や食品分析の分野で普及してきた。既に、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、その反応における酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することにより、アマドリ化合物を定量する分析法が提案されている（例えば、特公平5-3399号公報、特公平6-65300号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報、特開平4-4874号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量法も開示されている（特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報）。

【0005】アマドリ化合物の酸化還元酵素による分解反応は下記の一般式で表すことができる。



上記の反応を触媒する酵素として以下のものが知られている。

1. フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属（特公平5-33997号公報、特公平6-65300号公報）、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)（特開平3-155780号公報）。

2. フルクトシルアミンデグリカーゼ：カンジダ属 (*Candida*)（特開平6-46846号公報）。

4

3. フルクトシルアミノ酸分解酵素：ペニシリウム属 (*Penicillium*)（特開平4-4874号公報）。
4. ケトイミンオキシダーゼ：コリネバクテリウム属、フサリウム属、アクレモニウム属又はデブリオマイセス属（特開平5-192193号公報）
5. アルキルリジナーゼ：J. Biol. Chem. 239巻、第3790-3796頁 (1964年)

記載の方法で調製。

【0006】

- 10 【発明が解決すべき課題】しかしながら、これらの酵素による方法には、下記の問題点があった。即ち、糖尿病の診断における指標となる、血中の糖化タンパクは糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン及びフルクトサミンである。糖化アルブミンはタンパク分子中のリジン残基のε位にグルコースが結合して生成される [J. Biol. Chem. 261: 13542-13545 (1986)]。糖化ヘモグロビンは [J. Biol. Chem. 254: 3892-3898 (1979)]、ヘモグロビンβ鎖のN末端バリンにもグルコースが結合している。従って糖尿病の指標となる糖化タンパクの測定には、フルクトシルリジン及びフルクトシルバリンに対する特異性の高い酵素を用いる必要があった。しかし、既存のコリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素は、糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については明らかにされていない。他方、特開平5-192193号公報記載のケトイミンオキシダーゼはフルクトシルバリンは分解し得るが、リジン残基に糖が結合している糖化タンパクを正確に測定することはできない。フルクトシルアミンデグリカーゼは、ジフルクトシルリジンに高い活性があるのでリジン残基のε位の糖化物を特異的に測定することができず、またバリン残基の糖化物を特異的に測定することもできない。さらにアルキルリジナーゼを用いる方法は糖類以外がリジンに結合した物質に対しても作用し、糖化物に対する特異性が低いという問題があり、正確な測定が期待できなかった。特開平4-4874号公報記載のペニシリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンとフルクトシルアラニンに作用する酵素である。このように、従来の酵素は糖化タンパクの正確な定量には適さず、フルクトシルリジン及びフルクトシルバリンに対する特異性が高い酵素の開発が待たれていた。
- 20 【0007】一般的に、酵素を用いる分析法が正確かつ有用となるためには、分析の目的に最適な酵素を選択する必要がある。即ち、酵素の基質である被検物質の種類、測定試料の状態、測定条件など、種々の条件を考慮して適切な酵素を用いなければ、再現性のある正確な分析を行う事ができない恐れがある。そのような酵素を選択するためには、予め様々な酵素について、活性、基質特異性、温度安定性、pH安定性などが特定されなければならない。従って、より多くのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生産し、それらの特性を明らかにし
- 30
- 40
- 50

ておくことが望ましい。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アマドリ化合物、特に糖化タンパクに特異的に作用する新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供することを目的として、錠剤研究を重ねた結果、フサリウム属 (Fusarium) の菌をフルクトシルリジン及び／又は、フルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジンの存在下で培養すると、目的的活性を有する酵素が誘導されることを見いだし、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、フサリウム属 (Fusarium) の菌を、フルクトシルリジン及び／又は、フルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地で培養することにより生産されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供するものである。

【0009】本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産菌の培養に用いるフルクトシルリジン及び／又は、フルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地は、グルコースとリジン及び／又はN<sup>α</sup>-Z-リジンを温度100～150℃において3～60分間、オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジン及び／又は、フルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン（以下、F Z Lと略称することもある。）を含有する。後述するように、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルリジン及びフルクトシルバリンの両者に活性があるが、その活性は、前者に対する活性が後者に対する活性と同等かより高いという特徴を有する。なお、本明細書中では、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをFAODと称することもある。

【0010】本発明の酵素は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産能を有するフサリウム属の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地で培養することにより生産することができる。そのような菌として、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. リニ (IFO NO. 5880) (Fusarium oxysporum f. sp. lini)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. バタタス (IFO NO. 4468) (Fusarium oxysporum f. sp. batatas)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. ニベウム (IFO NO. 4471) (Fusarium oxysporum f. sp. niveum)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. ククメリニウム (IFO NO. 6384) (Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. メロンゲナエ (IFO NO. 7706) (Fusarium oxysporum f. sp. melongenae)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. アピ (IFO NO. 9964) (Fusarium oxysporum f. sp. apii)、フサリウム・オキシスポルム・f. sp. ピニ (IFO NO. 9971) (Fusarium oxysporum f. sp. pini)及びフサリウム・オキシスポルム・f. sp. フラガリエ (IFO NO. 31180) (Fusarium oxysporum f. sp. fragariae)などの種を挙げることができる。

【0011】本発明のFAOD類は、一般に、下記の理化学的特性を有する。

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
  - 2) 安定pHは4.0～13.0、至適pHは8.5であり；
  - 3) 安定温度は20～50℃、至適温度は30～35℃である；
  - 4) スーパーデックス200pgを用いたグルロ過法で測定した場合、分子量は約106,000 (106 kD) である。
- 【0012】本発明のFAODの生産に用いるフルクトシルリジン及び／又はF Z Lは、グルコース0.01～50重量%とリジン及び／又はN<sup>α</sup>-Z-リジン0.01～20重量%とを溶液中で、100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理する方法で製造される。具体的には、全量1000mlの溶液中にグルコース200g、N<sup>α</sup>-Z-リジン10gを溶解させ、通常120℃、20分間オートクレーブ処理することによって製造することができる。また、本発明のFAODの生産に用いるフルクトシルリジン及び／又はF Z L含有培地（以下、F Z L培地と称する）は、上記の方法で得られたフルクトシルリジン及び／又はF Z Lを通常の培地に添加するか、例えば、グルコース0.01～50重量%、リジン及び／又はN<sup>α</sup>-Z-リジン0.01～20重量%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1重量%、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1重量%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05重量%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01重量%及び酵母エキス0.2重量%を含有する混合物（好ましくはpH 5.6～6.0）を100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することによって得ることができる。
- 【0013】本発明のFAODの生産に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源を含有する通常の合成あるいは天然の培地であってよく、炭素源としては、例えば、グルコース、キシロース、グリセリン等、窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキス、等を用いることができる。さらに無機物としてはナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、コバルト等、通常の培地に含有されるものを用いることができる。本発明のFAODは、フルクトシルリジン及び／又はF Z Lを含有する培地で培養したとき、最もよく誘導される。好ましい培地の例として、上記の方法で得られたF Z Lを唯一の窒素源とし、炭素源としてグルコースを用いるF Z L培地（1.0%グルコース、0.5%F Z L、1.0%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.01%CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O及び0.01%ビタミン混合物）を挙げることができる。特に好ましい培地は、全量1,000ml中にグルコース20g (2%)、F Z L 10g (1%)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g (0.1%)、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g (0.1%)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g

(0.05%)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g (0.01%) 及び酵母エキス 2.0 g (0.2%) を含有する培地 (pH 5.6-6.0) である。FZL 培地は、通常の培地に FZL を添加するか、グルコースと  $\text{N}^{\alpha}-\text{Z}-\text{リジン}$  を含有する培地をオートクレーブ処理することによって調製することができる。いずれの方法によつても得られる培地はフルクトシルリジン及び/又は FZL の存在によって褐色を呈しており、FZL 褐変化培地又は GL (グリケーテッドリジン及び/又はグリケーティド  $\text{N}^{\alpha}-\text{Z}-\text{リジン}$ ) 褐変化培地と称する。

【0014】培養は、通常、25~37°C、好ましくは 28°C で行われる。培地の pH は 4.0~8.0 の範囲であり、好ましくは 5.5~6.0 である。しかしながら、これらの条件はそれぞれの菌の状態に応じて適宜調製されるものであり上記に限定されない。例えばフサリウム・オキシスポルム・f. sp. リニをこの条件下、20~100 時間、好ましくは 80 時間培養すると、FAOD が培養培地に蓄積される(図1)。このようにして得られた培養物は、常法に従い、核酸、細胞壁断片等を除去し、酵素標品を得ることができる。本発明の FAOD の酵素活性は菌体中に蓄積されるので、培養物中の菌体を破碎し、酵素生産に用いる。細胞の破碎は、機械的手段又は溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。酵素の分離精製方法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー やゲルろ過、アフィニティクロマトグラフィーなどを組み合わせて精製する。例えば、培養物を、遠心又は吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、0.1M トリス-塩酸 (pH 8.5) に懸濁し、Dino-Mill によって菌糸体を破碎する。次いで、遠心分離して得た上清を無細胞抽出液として、硫酸分画、フェニルセファロース疎水クロマトグラフィーで処理することにより精製する。

【0015】しかしながら、本発明の目的から、FAOD は、その精製度にかかわらず、アマドリ化合物の酸化反応を触媒することができる限り、培養液をはじめとする、あらゆる精製段階の酵素含有物及び溶液を包含する。また、酵素分子の内、触媒活性に関与する部位のみでも、本発明目的を達成することができることから、任意の、アマドリ化合物酸化活性を有するフラグメントをも包含するものとする。このようにして得られた FAOD は、アマドリ化合物の定量、特に糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量に有用である。従つて、本発明は、遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び/又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシ

ダーゼを生産させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。さらに、本発明は、フサリウム属の、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生産することができる菌株をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル  $\text{N}^{\alpha}-\text{Z}-\text{リジン}$  含有培地で培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの生産方法を提供するものである。これらの属の菌株が生産する FAOD はいずれも本発明が解決すべき技術的な課題の解決に有用である。本明細書では、適宜、必要に応じてフサリウム・オキシスポルム・f. sp. リニ由来の FAOD を FAOD-L と呼称することもある。

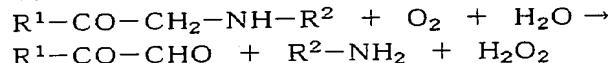
【0016】以下に本発明の FAOD の特性を詳細に説明する。

### 1. 一般的な誘導特性

本発明の FAOD はフルクトシルリジン及び/又は FZL によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又は FZL を窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又は FZL 培地で、フサリウム属のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産菌を培養することにより生産される。FAOD は、グルコースとリジン及び/又は  $\text{N}^{\alpha}-\text{Z}-\text{リジン}$  を共にオートクレーブして得られる GL 褐変化培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又は  $\text{N}^{\alpha}-\text{Z}-\text{リジン}$  を別々にオートクレーブ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。

### 【0017】2. 反応特異性及び基質特異性

本発明の FAOD は、式:



(式中、 $\text{R}^1$  はアルドース残基、 $\text{R}^2$  はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す) で示される反応における触媒活性を有する。上記の反応式において、 $\text{R}^1$  が  $-\text{O}-\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  又は  $[\text{CH}(\text{OH})]_n-\text{CH}_2\text{O}-\text{H}$  (式中、 $n$  は 0~6 の整数) であり、 $\text{R}^2$  が  $-\text{CHR}^3 - [\text{CONHR}^3]_m\text{COOH}$  (式中、 $\text{R}^3$  は  $\alpha$ -アミノ酸側鎖残基、 $m$  は 1~480 の整数を表す) で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、 $\text{R}^3$  がリジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、また  $n$  が 5~6、 $m$  が 5 以下である化合物が好ましい。

【0018】本発明の FAOD の各基質に対する活性を以下の表1 に示す。

表1 精製された FAOD-L の基質特異性

【表1】

基質	濃度	比活性 (%)
N'-フルクトシル N'-Z-リジン	1.67 mM	100
フルクトシルバリン	1.67	30.1
N'-メチル-L-リジン	1.67	N. D. <sup>*1</sup>
N'-フルクトシルポリ-L-リジン	0.02%	0.24
ポリ-L-リジン	0.02	N. D.
FBSA <sup>*2</sup>	0.17	N. D.
FHSA <sup>*3</sup>	0.17	N. D.
トリプチックFBSA	0.17	0.62
トリプチックFHSA	0.17	N. D.

\*1: 検出されず

\*2: フルクトシル牛血清アルブミン

\*3: フルクトシルヒト血清アルブミン

表1から、フルクトシルN'-Z-リジン及びフルクトシルバリンに対して高い特異性を有する。また、本発明のFAODはフルクトシルポリリジンに対する活性を有

し、さらに糖化タンパクのプロテアーゼ消化物に対する活性もある。フサリウム属のFAOD生産能力を有する菌株を下記表2に例示する。

表2 FZL褐変化培地で培養したフサリウム属の菌から精製したFAODの基質特異性

### 【表2】

IFO No.	<i>F. oxysporum</i> f. sp.	比活性 (10 <sup>-2</sup> U/mg・タンパク)		L/V <sup>1)</sup>
		フルクトシルN'-Z-リジン	フルクトシルバリン	
4468	<i>batatas</i>	3.76	0.228	16.5
4471	<i>niveum</i>	3.37	0.340	9.9
5880	<i>lini</i>	48.6	13.5	3.6
6384	<i>cucumerinum</i>	2.26	0.234	9.7
7706	<i>melongenae</i>	4.86	0.276	17.6
9964	<i>apii</i>	2.65	0.169	15.7
9971	<i>pini</i>	1.92	0.138	13.9
31180	<i>fragariae</i>	25.2	2.27	11.1

1) : (フルクトシルN'-Z-リジンに対する活性) / (フルクトシルバリンに対する活性)

【0019】表2に示されているように、本発明のFAODは、フルクトシルリジン及びフルクトシルバリンの両者に対して活性を有しており、このことは該FAODが糖化ヘモグロビンの測定にも有用であることを示唆するものである。

### 【0020】3. pH及び温度条件

#### pH条件の検討

至適pHは、通常のFAOD活性測定法(後述の4. 力価の測定法参照)で使用する緩衝液をpH4~13の各種緩衝液(0.1Mリン酸カリウム緩衝液(KPB)、トリス-塩酸緩衝液及びグリシン(Gly)-NaOH緩衝液)に置き換えて酵素反応を行い検討した。また、前記の各種緩衝液にFAODを添加し、30°Cで10分間インキュベートした後、通常の条件(30°C、pH8.0)で活性を測定する事によりpHによる安定性を検討した。

#### 温度条件の検討

至適温度を検討するために、反応温度を20~60°Cま

で変化させて酵素活性を測定した。温度安定性については、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解したFAODを20~60°Cの各温度で10分間インキュベートし、その酵素液を用いて通常の条件で残存活性を測定した。上記方法で測定した結果、本発明のFAODの至適pHは、7.5~9.0、より好ましくは8.5であり(図2)、安定なpH域は、4.0~13.0であった。また、FAOD酵素反応は20~50°C、好ましくは25~40°C、より好ましくは35°Cで効率よく進行した(図3)。安定な温度領域は20~50°Cであった。

### 【0021】4. 力価の測定

酵素の力価測定は下記の方法で行った。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方法。

#### A. 速度法

100mM FZL溶液はあらかじめ得られたFZLを蒸留水で溶解することによって調製した。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液、及び60mM フェノール溶液それぞれ10

11

$0\text{ }\mu\text{l}$  と、 $0.1\text{ M}$  トリス-塩酸緩衝液 ( $\text{pH }8.0$ )  $1\text{ mL}$ 、及び酵素溶液  $50\text{ }\mu\text{l}$  を混合し、全量を蒸留水で  $3.0\text{ mL}$  とする。 $30^\circ\text{C}$  で 2 分間インキュベートした後、 $100\text{ mM}$  FZL 溶液  $50\text{ }\mu\text{l}$  を添加し、 $50\text{ nm}$  における吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数 ( $5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から、1 分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位 (ユニット: U) とする。

## 【0022】B. 終末法

上記 A 法と同様に処理し、基質添加後、 $30^\circ\text{C}$  でインキュベートした後の  $50\text{ nm}$  における吸光度を測定し、あらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成した検量線から生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

## (2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

原料 (1 mM)	比活性 (%)	原料 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100	$\text{FeSO}_4$	93
$\text{LiCl}$	99	$\text{CoSO}_4$	110
$\text{KCl}$	104	$\text{CuCl}_2$	35
$\text{NaCl}$	109	$\text{ZnSO}_4$	11
$\text{RbCl}$	109	$\text{AgNO}_3$	0
$\text{CsCl}$	108	$\text{BaCl}_2$	116
$\text{MgCl}_2$	103	$\text{HgCl}_2$	0
$\text{CaCl}_2$	98	$\text{FeCl}_3$	77
$\text{MnCl}_2$	143		

表 3 から明らかなように、本発明の FAOD の活性に対し、銅イオン、亜鉛イオンが阻害的であり、銀イオン及び水銀イオンは完全に阻害する。

## 【0024】(2) 各種阻害物質の影響

上記 (1) の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。ただし、パラクロロ安息香酸第二水銀は終濃度  $0.1\text{ mM}$ 、それ以外は  $1\text{ mM}$  とした。結果を表 4

試薬 (1 mM)	比活性 (%)	試薬 (1 mM)	比活性 (%)
None	100	セミカルバジド	96
PCMB*	0	フェニルヒドラジン	49
DTNB**	0	ヒドラジン	10
ヨード酢酸	90	ヒドロキシルアミン	17
$\text{NaN}_3$	102	クロルギリシン	N. D.* <sup>3</sup>
$\alpha, \alpha'$ -シビリジル	103	デブレニル	104
ローフェナスロリン	114	アミノグアニジン	73

\* 1 : PCMB, パラクロロ安息香酸第二水銀

\* 2 : DTNB, 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)

\* 3 : 検出できず

表 4 から明らかに、FAOD 活性は PCMB、DTNB、ヒドラジン、フェニルヒドラジンにより、強く阻害された。これより、酵素反応には SH 基及びカルボニル基が重要な働きをしていることが予想される。他方、ジ

50

## 【0023】5. 酵素の阻害、活性化及び安定化

## (1) 金属の影響

0.1M トリス-塩酸緩衝液 ( $\text{pH }8.0$ )  $1\text{ mL}$  と酵素溶液  $50\text{ }\mu\text{l}$  を混合し、蒸留水で全量を  $3.0\text{ mL}$  とし、ランク ブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。 $30^\circ\text{C}$  で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、 $50\text{ mM}$  FZL  $100\text{ }\mu\text{l}$  を添加し、酸素吸収を記録計で連続的に計測し、初速度を得る。標準曲線から 1 分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とする。

## 表 3 金属イオンの FAOD-L 活性への影響

【表 3】

10

0.1M トリス-塩酸緩衝液 ( $\text{pH }8.0$ ) に、各種金属イオンを終濃度  $1\text{ mM}$  となるように添加し、 $30^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表 3 に示す。

## 表 3 金属イオンの FAOD-L 活性への影響

【表 3】

13

チオスレイトールによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスレイトール2 mMを添加した50 mMトリス一塩酸緩衝液(pH 8.5)である。

【0025】6. 分子量

SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動)は、デービスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40 mAで、3時間泳動し、タンパク染色は、クマシーブリリアントブルーG-250を行った。標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドライゼ、大豆トリプシンインヒビターを同様に泳動し、検量線を作成して分子量を求めた。その結果、サブユニットの分子量は、約51,000(51 kDa)であった

14

(図4)。スーパーデックス200 pgによるゲルろ過では、分子量は約106,000(106 kDa)と求められ(図5)、本発明のFAODは二量体であることが示唆された。

【0026】7. 等電点

ディスク焦点電気泳動法によって測定した結果、FAODは $pI = 6.8$ であった。

【0027】8. 既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のFAODとを比較した。

表5 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表5】

生産菌	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Inji</i> (IF05880)	<i>Corynebacterium</i> sp. <sup>1)</sup> (IF05880)	<i>A. pergillosus</i> sp. <sup>2)</sup>
分子量 (ゲル過) (SDS-PAGE)	106,000 51,000	88,000 44,000	83,000 43,000
補酵素	FADと共有結合	FADと非共有結合	FADと非共有結合
基質特異性(U/mg・タブリケ) (フルクトシル) (ガラクトシル)	18.5 <sup>3)</sup> 6.83	N.D. <sup>4)</sup> 7.09	11.28 <sup>4)</sup> 59.8
ミハエリス定数 (FZL)	0.37M	0.74M (Gly)	2.2M (Gly)
至適pH	8.5	8.3	7.7
至適温度(°C)	30~35	40	40
等電点	6.8	4.6	6.8
SHMPによる影響	あり	なし	あり
N. D. : 検出できず			

1) ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110 (1989)

2) ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338 (1991)

3) フルクトシルN<sup>ε</sup>-Z-アーリジンに対する比活性

4) N<sup>ε</sup>-D-フルクトシルN<sup>ε</sup>-ホルミルリジンに対する比活性

表5から、本発明のFAODと他の2種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違：本発明のFAODは他の2種の酵

素よりも明らかに分子量が大きい。

(2) 補酵素：本発明のFAODは補酵素として共有結合的に結合したFADを有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合したFADを有する。

(3) 基質特異性：本発明のFAODは、フルクトシルバリンよりもフルクトシルリジンに対する特異性が高いが、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

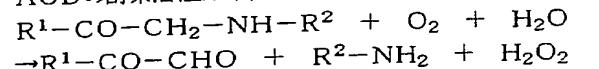
(4) ミハエリス定数：本発明のFAODの基質フルク

17

トシルリジンに対する親和性が、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適pH、至適温度、及びSH試薬による阻害：本発明のFAODと他の2酵素との相違を示している。

【0028】既述のごとく、本発明の酵素FAODは、アマドリ化合物の定量に有用である。従って、本発明は、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFAODとを接触させ、酵素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分析法は、生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量に基づいて行われる。FAODの酵素活性は下記の反応に基づいて測定される。



(式中、R<sup>1</sup>はアルドース残基、R<sup>2</sup>はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す)

被検液としては、アマドリ化合物を含有する任意の試料溶液を用いることができ、例えば、血液(全血、血漿又は血清)、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。

【0029】本発明のFAODをアマドリ化合物含有溶液に、適当な緩衝液中で作用させる。反応溶液のpH、温度は、上記の条件を満たす範囲、即ち、pH 4.0～13.0、好ましくは8.5、温度は20～50℃、好ましくは35℃である。緩衝液としてはトリス-塩酸等を用いる。FAODの使用量は、終点分析法においては通常、0.1ユニット/ml以上、好ましくは1～100ユニット/mlである。

【0030】本発明の分析法では、下記のいずれかのアマドリ化合物の定量法を用いる。

#### (1) 過酸化水素発生量に基づく方法

当該技術分野で既知の過酸化水素の定量法、例えば、発色法、過酸化水素電極を用いる方法等で測定し、過酸化水素及びアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記4の力価の測定に準じる。ただし、FAOD量は1ユニット/mlとし適当に希釈した試料を添加し、生成する過酸化水素量を測定する。過酸化水素の発色系としては、パーオキシダーゼの存在下で4-アミノアンチピリン、3-メチル-2-ベンゾチアソリノヒドラゾン等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により発色する系を用いることができる。色原体として、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等があり、例えば、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、2,4-ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホ

10

20

30

40

50

18

プロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン等が挙げられる。又パーオキシダーゼの存在下で酸化発色を示すロイコ型発色試薬も用いることができ、そのようなロイコ型発色試薬は、当業者に既知であり、o-ジアニシン、o-トリジン、3,3-ジアミノベンジジン、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン、10-カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等が挙げられる。

#### (2) 酵素の消費量に基づく方法

反応開始時の酵素量から反応終了時の酵素量を差し引いた値(酵素消費量)を測定し、酵素消費量とアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記4の力価の測定に準じて行う。但し用いるFAOD量は1ユニット/mlとし、適当に希釈した試料を添加し消費される酵素量を求める。

【0031】本発明方法は試料溶液をそのまま用いて行うことができるが、対象となる糖化タンパクによっては、あらかじめ糖が結合したリジン及び/又はバリン残基を遊離させてから行なうことが好ましい。そのような目的には、タンパク質分解酵素を用いる場合(酵素法)と、塩酸等の化学物質を用いる場合(化学法)があるが、前者が好ましい。その場合、本発明方法には当業者に既知である、エンド型及びエキソ型のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)を用いることができる。エンド型のプロテアーゼには、例えばトリプシン、α-キモトリプシン、スプチリシン、プロティナーゼK、パンペイン、カテーピシンB、ペプシン、サーモリシン、プロテアーゼXIV、リジルエンドペプチダーゼ、プロレザー、プロメラインF等がある。一方、エキソ型のプロテアーゼにはアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等が挙げられる。酵素処理の方法も既知であり、例えば下記実施例に記載の方法で行なうことができる。

【0032】上記のごとく、本発明のFAODは、糖化タンパクに含まれるフルクトシルリジンに高い基質特異性を有するものであることから、血液試料中の糖化タンパクを測定することを含む、糖尿病の診断などに有用である。また、フルクトシルバリンにも特異性を有することから、糖化ヘモグロビンの測定にも有用である。なお、検体として血液試料(全血、血漿又は血清)を用いる場合、採血した試料をそのまま、あるいは透析等の処理をした後用いる。さらに、本発明方法に用いるFAOD、パーオキシダーゼ等の酵素は、溶液状態で用いてよいが、適当な固体支持体に固定化してもよい。例えば、ビーズに固定化した酵素をカラムに充填し、自動化装置に組み込むことにより、臨床検査など、多数の検体

19

の日常的な分析を効率的に行うことができる。しかも、固定化酵素は再使用が可能であることから、経済効率の点でも好ましい。さらには、酵素と発色色素とを適宜組み合わせ、臨床分析のみならず、食品分析にも有用なアマドリ化合物の分析のためのキットを得ることができる。

【0033】酵素の固定化は当該技術分野で既知の方法により行うことができる。例えば、担体結合法、架橋化法、包括法、複合法等によって行う。担体としては、高分子ゲル、マイクロカプセル、アガロース、アルギン酸、カラギーナン、などがある。結合は共有結合、イオン結合、物理吸着法、生化学的親和力を利用し、当業者既知の方法で行う。固定化酵素を用いる場合、分析はフロー又はバッチ方式のいずれでもよい。上記のごとく、固定化酵素は、血液試料中の糖化タンパクの日常的な分析（臨床検査）に特に有用である。臨床検査が糖尿病診断を目的とする場合、診断の基準としては、結果を糖化タンパク濃度として表すか、試料中の全タンパク質濃度に対する糖化タンパク質の濃度の比率（糖化率）又はフルクトサミン値で表す。全タンパク質濃度は、通常の方法（280nmの吸光度、プラッドフォード法、Lowry法、ビュレット法、アルブミンの自然蛍光、ヘモグロビンの吸光度など）で測定することができる。

【0034】本発明はまた、本発明のFAODを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキットを提供するものである。本発明のアマドリ化合物の定量のための試薬は、本発明のFAODと好ましくはpH7.5~8.5、より好ましくはpH8.0の緩衝液からなる。該FAODが固定化されている場合、固体支持体は高分子ゲルなどから選択され、好ましくはアルギン酸である。試薬中のFAODの量は、終点分析を行う場合、試料あたり、通常1~100ユニット/ml、緩衝液はトリス-塩酸（pH8.0）が好ましい。過酸化水素の生成量に基づいてアマドリ化合物を定量する場合、発色系としては、先述の「(1)過酸化水素発生量に基づく方法」に記載の酸化縮合により発色する系、並びにロイコ型発色試薬等を用いることができる。本発明のアマドリ化合物の分析試薬と、適当な発色剤ならびに比較のための色基準あるいは標準物質を組み合わせてキットとすることもできる。そのようなキットは、予備的な診断、検査に有用であると考えられる。上記の分析試薬及びキットは生体成分中の糖化タンパク量及び/又は糖化率の測定、あるいは、フルクトサミンを定量するために、用いられるものである。以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく述べる。

### 【0035】

#### 【実施例】

実施例1 フサリウム・オキシスポルム・f. sp.・リニ  
の培養とFAOD-Lの精製

#### 1) 培養

20

フサリウム・オキシスポルム・f. sp.・リニ (IFO NO. 5880; Fusarium oxysporum f. sp. lini) をFZL 0.5%、グルコース 1.0%、リン酸二カリウム 0.1%、リン酸一ナトリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス 0.2%を含有した培地 (pH6.0) 10Lに植菌し、ジャーファーメンターを用いて通気量 2 L./分、攪拌速度 400 rpm の条件で 28°C、80 時間攪拌培養した。培養物は濾過して集めた。

#### 2) 粗酵素液の調製

菌糸体 270 g (湿重量) を、2 mMのDTTを含む、0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) 800 ml に懸濁し、Dino-Millにより菌糸体を破碎した。破碎液を 9,500 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた上清 (無細胞抽出液) を粗酵素液として、以下の方法で精製した。

#### 3) 精製

##### ステップ1：硫安分画

粗酵素液に 40% 飽和になるように硫酸アンモニウム (以下、硫安と略す) を加え、遠心分離 (4°C, 12,000 rpm) して余分なタンパクを除去した。さらに、上清に硫安を 75% 飽和になるように添加して沈殿を回収した。

##### ステップ2：疎水クロマトグラフィー (バッチ法)

ステップ1で得られた沈殿を、2 mMのDTTを含むする 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) (以下、緩衝液Aと略す) に溶解し、等量の硫安 40% を含む緩衝液Aを添加した。同粗酵素液にブチルトヨパール (butyl-TOYOPEARL) 樹脂 200 ml を加えて、バッチ法による吸着を行った。溶出も、緩衝液Aを用いたバッチ法で行い、活性画分は硫安沈殿により濃縮した。

##### ステップ3：疎水クロマトグラフィー

25% 硫安を含む緩衝液Aで平衡化したフェニルトヨパール (phenyl-TOYOPEARL) カラムに濃縮した活性画分を吸着させ、同緩衝液で洗浄後、25~0% 硫安の直線勾配で溶出した。回収した活性画分は硫安沈殿により濃縮し、次のステップに用いた。

##### ステップ4：疎水クロマトグラフィー (カラム法)

回収した活性画分をブチルトヨパールカラム (40% 硫安を含む緩衝液Aで平衡化) に用いた。濃縮液を吸着させ、同緩衝液で洗浄した。活性画分は 40~0% 硫安の直線勾配で得られた。

##### ステップ5：イオン交換クロマトグラフィー

次に、DEAE-トヨパール (DEAE-TOYOPEARL) カラムクロマトグラフィーを行った (緩衝液Aで平衡化)。洗浄画分にFAOD活性が認められたため、これを回収して硫安で濃縮してから、次のステップに用いた。

##### ステップ6：ゲル濾過

最後にセファクリル-300によるゲル濾過をおこなつ

21

た(0.1M NaCl, 2mM DTTを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化)。これにより、70~100ユニットの酵素標品を得た。

**【0036】**精製酵素のUV吸収スペクトルを図6に示す。図6は、本酵素がフラビン酵素であることを示している。またSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリラミド電気泳動)及びスーパーデックス200pgを用いたゲル滌過により得られた精製酵素の標品の分子量の決定を行った。SDS-PAGEは、デーピスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40mAで3時間泳動し、タンパク染色はクマシーブリリアントブルーG-250でおこなった。標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドライゼ、大豆トリプシンインヒビターを同様に泳動して検量線を作成した。その結果、精製酵

## 1) プロテアーゼ処理

糖化アルブミン溶液

12.5mg/ml プロテアーゼXIV(シグマ社)溶液

この混合液を37°Cで30分間インキュベートし、その

## 2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

4.5mM 4-アミノアンチピリン溶液

6.0mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-

3-スルホプロピル)-m-トルイジン溶液

6.0ユニット/ml バーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)

6ユニット/ml FAOD-L溶液

60μl

60μl

後、約90°Cで5分間、加熱して反応を停止させた。

蒸留水で全量を1mlとした。6ユニット/ml FAOD-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを6ユニット/mlになるよう、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で希釈して調製した。FAOD反応液を30°Cで2分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を100μl加え、30分後の555nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られる糖化アルブミンの濃度と吸光度との関係を図7に示す。図中の縦軸は555nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸は糖化アルブミンの濃度を表す。図は、糖化アルブミンの濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示して

## 1) プロテアーゼ処理

糖化アルブミン溶液

12.5mg/ml プロテアーゼXIV(シグマ社)溶液

この溶液を37°Cで30分間インキュベートし、その

## 2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

4.5mM 4-アミノアンチピリン溶液

6.0mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-

3-スルホプロピル)-m-トルイジン溶液

6.0ユニット/ml バーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)

6ユニット/ml FAOD-L溶液

60μl

60μl

後、約90°Cで5分間、加熱して反応を停止させた。

いる。

## 【0038】実施例3 ヒト血清アルブミンの糖化率の

## 測定

0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mg、ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶

液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作製し、自動グリコアルブミン測定装置(京都第一科学)を用いて検定したところ、その糖化率は、24.6%~61.1%であった。これらの溶液を用いて以下の操作を行った。

60μl

60μl

後、約90°Cで5分間加熱して反応を停止させた。

60μl

60μl

30μl

30μl

300μl

50μl

蒸留水で全量を1mlとした。6ユニット/ml FAOD-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを6ユニット/mlになるよう、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で希釈して調製した。FAOD反応液を30°Cで2分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を100μl加え、30分後の555nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図8に示す。図中の縦軸は

## 1) プロテアーゼ処理

糖化ヘモグロビン溶液	25 μl
500ユニット/ml アミノペプチダーゼ溶液	5 μl
0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)	20 μl

この混合液を30°Cで30分間インキュベートした。その後、10%トリクロロ酢酸を50μl加えて攪拌し、0°Cで30分間静置した後12000rpmで10分間遠

## 2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-	
ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン溶液	30 μl
60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	30 μl
0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)	300 μl
4ユニット/ml FAOD-L溶液	10 μl

蒸留水で全量を1mlとした。4ユニット/ml FAOD-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを4ユニット/mlになるよう、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で希釈して調製した。FAOD反応液を30°Cで2分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を80μl加え、30分後の727nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られる糖化ヘモグロビンの濃度と吸光度との関係を図9に示す。図中の縦軸は727nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸は糖化ヘモグロビンの濃度を表す。図は、糖化ヘモグロビンの濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

## 【0040】

【発明の効果】本発明のFAODは、従来の同種の酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと異なり、フルクトシルリシン及びフルクトシルバリンのいずれにも特異的に作用し、また、前者に対する特異性がより高い。従つて、新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、糖尿病の診断や食品の品質管理の面で寄与するところが大きい。特に、血中の糖化タンパク量及び/又は糖化率あるいはフルクトサミン量を指標として、糖尿病の病状の診断に役立つと考えられる。また、本発明のFAODを用いるアマドリ化合物の分析試薬及び分析方法に

555nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸はアルブミンの糖化率を表す。図は、アルブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0039】実施例4 糖化ヘモグロビン濃度の測定  
グリコヘモグロビンコントロール(シグマ社)を蒸留水で溶解させ、0~30%の範囲で濃度の異なる糖化ヘモグロビン溶液を調製した。これらの溶液を用いて以下の操作を行った。

糖化ヘモグロビン溶液	25 μl
500ユニット/ml アミノペプチダーゼ溶液	5 μl
0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)	20 μl

心分離を行った。得られた上清に2M NaOHを約50μl加え中性溶液にした。

よって、正確に糖化タンパクを定量することができ、糖尿病の診断、症状管理に貢献することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 培養培地でのFAODの生産量と培養時間の関係を示すグラフ。

【図2】 FAODの溶媒中での活性と至適pHの関係を示すグラフ。

【図3】 FAODの溶媒中での活性と至適温度の関係を示すグラフ。

【図4】 SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリラミドゲル電気泳動)におけるFAOD-Lの泳動パターンを示す写真の模写図。

【図5】 スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過によるFAOD-Lの分子量測定の結果を示すグラフ。

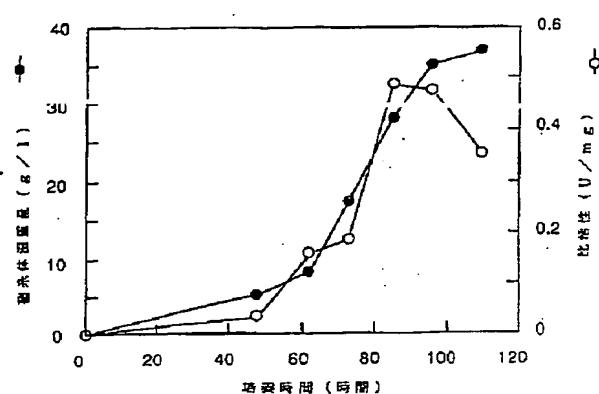
【図6】 FAOD-Lの吸収スペクトル。

【図7】 糖化ヒト血清アルブミンの濃度とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

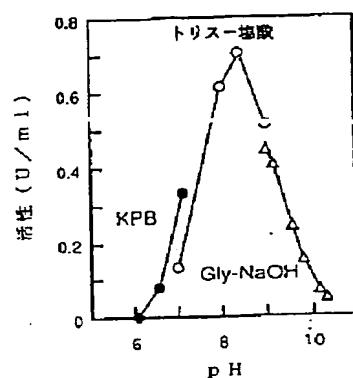
【図8】 ヒト血清アルブミンの糖化率とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図9】 糖化ヘモグロビンの濃度とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

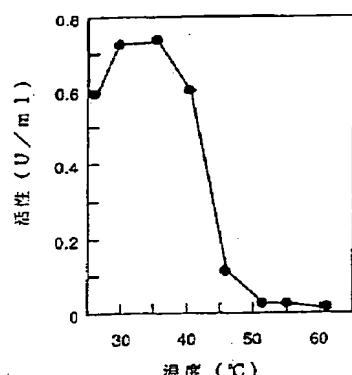
【図1】



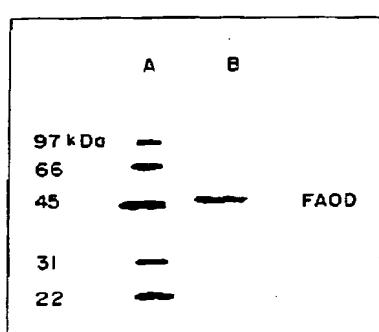
【図2】



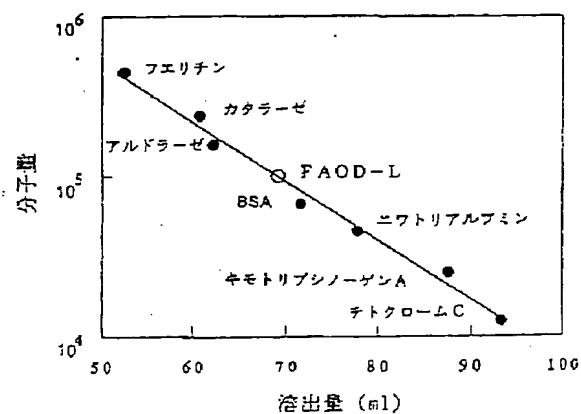
【図3】



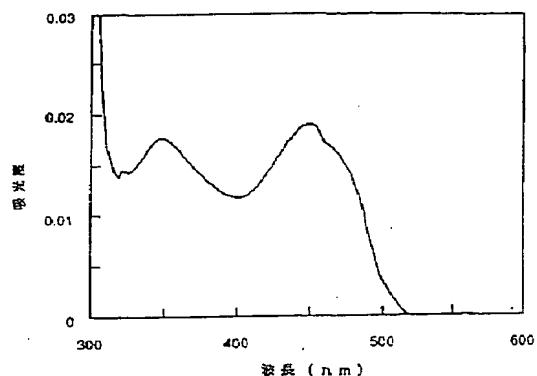
【図4】



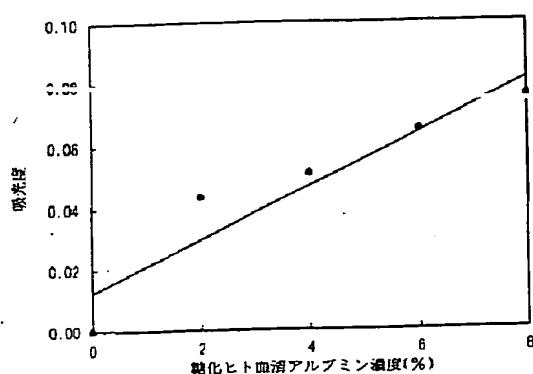
【図5】



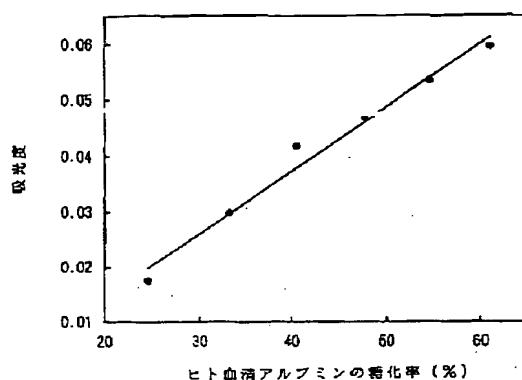
【図6】



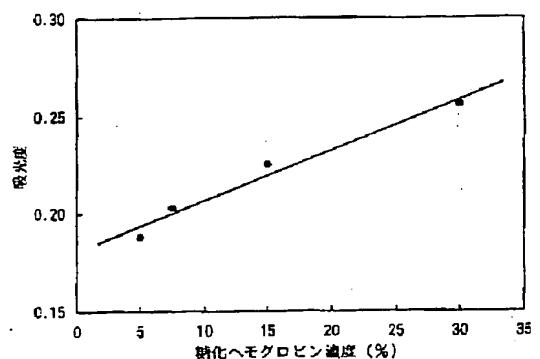
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 R 1:77)

(72) 発明者 酒井 敏克

京都府京都市左京区聖護院山王町28番地

(72) 発明者 石丸 香

京都府京都市伏見区北端町23番地2号 セント・アミューズ302号